

Attorney's Docket No.: 07898-053001 PH-710US
1646

IN THE UNITED STATES PATENT AND TRADEMARK OFFICE

RECEIVED
TECH. CENTER 1300/2900

00 FEB 11 AM 2:40

~~JRB~~
3/1/2000

Applicant : Yurino et al.
Serial No. : 09/459,712
Filed : December 13, 1999
Title : HYBRIDIZATION DETECTION METHOD AND BIOCHIPS

Art Unit : Unknown
Examiner : Unknown

Assistant Commissioner for Patents
Washington, D.C. 20231

TRANSMITTAL OF PRIORITY DOCUMENT UNDER 35 USC §119

Applicants hereby confirm their claim of priority under 35 USC §119 from Japanese Application Nos. 355956/1998, filed December 15, 1998, and 328352/1999, filed November 18, 1999. A certified copy of the applications from which priority is claimed is submitted herewith.

Please apply any charges or credits to Deposit Account No. 06-1050.

Respectfully submitted,

Date: 2/2/2000

Joseph R. Baker, Jr.
Reg. No. 40,900

JZB/jzb

Fish & Richardson P.C.
4225 Executive Square, Suite 1400
La Jolla, CA 92037
Telephone: (858) 678-5070
Facsimile: (858) 678-5099

10017348.doc

CERTIFICATE OF MAILING BY FIRST CLASS MAIL

I hereby certify under 37 CFR §1.8(a) that this correspondence is being deposited with the United States Postal Service as first class mail with sufficient postage on the date indicated below and is addressed to the Assistant Commissioner for Patents, Washington, D.C. 20231.

2/2/00

Date of Deposit

Signature

BRIGITTE CARIC

Typed or Printed Name of Person Signing Certificate



(Translation)

PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

Date of Application: November 18, 1999

Application Number: Japanese Patent Application
No. 328352/1999

Applicant(s): Hitachi Software Engineering Co., Ltd.

December 24, 1999

Commissioner,
Patent Office

Takahiko Kondo (seal)

Certificate No. 11-3090765



日本特許庁
PATENT OFFICE
JAPANESE GOVERNMENT

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出願年月日
Date of Application:

1999年11月18日

出願番号
Application Number:

平成11年特許願第328352号

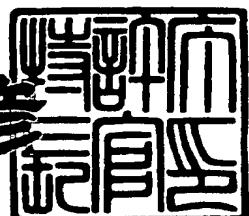
出願人
Applicant(s):

日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社

1999年12月24日

特許庁長官
Commissioner,
Patent Office

近藤 隆彦



出証番号 出証特平11-3090765

【書類名】 特許願
【整理番号】 11B013
【提出日】 平成11年11月18日
【あて先】 特許庁長官 殿
【国際特許分類】 C12Q 1/00
【発明の名称】 ハイブリダイゼーション検出方法及びバイオチップ
【請求項の数】 7
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフト
ウエアエンジニアリング株式会社内
【氏名】 百合野 以子
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフト
ウエアエンジニアリング株式会社内
【氏名】 山本 順次
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフト
ウエアエンジニアリング株式会社内
【氏名】 伊藤 敏明
【発明者】
【住所又は居所】 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地 日立ソフト
ウエアエンジニアリング株式会社内
【氏名】 渡辺 敏正
【特許出願人】
【識別番号】 000233055
【氏名又は名称】 日立ソフトウエアエンジニアリング株式会社
【代理人】
【識別番号】 100091096
【弁理士】

【氏名又は名称】 平木 祐輔

【選任した代理人】

【識別番号】 100102576

【弁理士】

【氏名又は名称】 渡辺 敏章

【先の出願に基づく優先権主張】

【出願番号】 平成10年特許願第355956号

【出願日】 平成10年12月15日

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 015244

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【包括委任状番号】 9722155

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 ハイブリダイゼーション検出方法及びバイオチップ

【特許請求の範囲】

【請求項1】 プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、

プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量とを検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項2】 プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、

プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量との差分を前記プローブの量で規格化した値を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項3】 請求項1又は2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、ハイブリダイゼーションを行う前にプローブの量を検出し、ハイブリダイゼーション終了後に前記プローブに結合したサンプルの量を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項4】 請求項1又は2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、ハイブリダイゼーション終了後にプローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量を検出することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項5】 請求項1又は2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、プローブとサンプルに各々異なる検出用の標識が付けられていることを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項6】 請求項2記載のハイブリダイゼーション検出方法において、検出されたプローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量との差分を前記プローブの量で規格化した値をディスプレイに表示することを特徴とするハイブリダイゼーション検出方法。

【請求項7】 蛍光物質で標識したプローブをスポットしたことを特徴とするバイオチップ。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】

本発明は、サンプル生体高分子とプローブ生体高分子とのハイブリダイゼーションを利用してサンプル生体高分子に目的とする配列が存在するか否かを分析するハイブリダイゼーション検出法、及びそれに用いられるバイオチップに関する。

【0002】

【従来の技術】

従来から、生体内の分子を同定・分画するために、特に目的DNAの検出、あるいは遺伝子DNAの有無検出などのために、既知の配列をもつ核酸や蛋白質をプローブとしてハイブリダイズする方法が多く用いられてきた。ハイブリダイゼーション検出の方法は、固定したプローブDNAに蛍光物質を標識したサンプルDNAを入れてハイブリダイズさせる。サンプルDNAがプローブDNAに結合すると、プローブDNAと一緒に固定され、光源からの励起光で蛍光物質を励起し、発光する蛍光を検出することでハイブリダイゼーションを検出していた。

【0003】

図7、図8、図9は、この従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図である。図7に示すように、一定量のプローブDNA 1aをガラスプレート4にスポット3aとして固定化する。別種のプローブDNA 1b、プローブDNA 1cも同様に、スポット3b、スポット3cとして固定化する。このとき、各スポット1a, 1b, 1cのプローブDNAを全て同量にして固定化することはできない。

【0004】

図8(a)に示すように、全てのサンプルDNA 5a, 5b, 5c, …を蛍光物質6で標識する。図8(b)に示すように、プローブDNAとサンプルDNAをハイブリダイズさせるために、スポットされたガラスプレート4と蛍光標識したサンプルDNA 5a, 5b, 5c, …をハイブリダイゼーション溶液7に入れ、ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液7は、ホルムアルデヒド、SSC (NaCl, trisodium citrate)、SDS (sodium dodecyl sulfate)

)、EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用するDNAの性質により異なる。

【0005】

このとき図8(c)に示すように、サンプルDNAとプローブDNAが相補鎖であればプローブDNA 1a, 1bとサンプルDNA 5a, 5bのようにハイブリダイゼーションして二重らせん構造で結合する。一方、両者が相補鎖DNAでなければ、プローブDNA 1cのようにサンプルDNAが結合しないでそのままである。ハイブリダイゼーションの検出は、図9に示すように、励起光源としてのランプ9からの励起光でガラスプレート4を照射して蛍光物質6を励起し、発光波長域以外の光を光学フィルター10でカットして、各スポットからの発光をCCDカメラなどの二次元光センサー8で検出する。

【0006】

この時、ハイブリダイゼーションが生じたスポット3a, 3bには蛍光物質6が存在するため、ランプ9からの励起光によって蛍光物質6が励起され、発光が検出される。一方、ハイブリダイゼーションが生じていないスポット3cには蛍光物質が存在しないため、ランプ9からの励起光照射によっても発光は生じない。このようにして、ハイブリダイゼーションが生じたか否かによってスポット毎に明暗が観察される。二次元光センサー8からの画像データは、コントローラ12によってコンピュータ13に転送され、ディスプレイに画像表示される。

【0007】

【発明が解決しようとする課題】

プローブDNAをガラスプレートに固定化するとき、全てのプローブを同じ量ずつ均等にスポットすることはできないため、プローブが多量に固定化されたスポットと少量に固定化されたスポットとではプローブDNAの量が異なる。このため、ハイブリダイゼーションの検出ではサンプルDNAがハイブリダイズしたか否かは判断できるが、どの位のプローブDNAにどの程度のサンプルDNAがハイブリダイスしたか定量的な測定を行うことはできなかった。

本発明は、このような従来技術の問題点に鑑みなされたもので、プローブDNAとサンプルDNAがどの程度ハイブリダイズしたか、定量的な測定が可能な検

出方法を提供することを目的とする。

【0008】

【課題を解決するための手段】

前記目的を達成するため、本発明では、プローブ生体高分子とサンプル生体高分子に各々異なる蛍光物質を標識し、蛍光物質の発光波長が異なることを利用して各スポット毎に、そのスポットに存在しているプローブ生体高分子とサンプル生体高分子を別々に検出できるようにする。また、ハイブリダイゼーションの検出で、プローブ生体高分子を標識している蛍光物質の発光波長とサンプル生体高分子を標識している蛍光物質の発光波長を分離検出することにより、各スポット毎にプローブ生体高分子の量及びそのプローブ生体高分子にハイブリダイズしたサンプル生体高分子の量を個別に検出して定量測定することを可能とする。

【0009】

すなわち、プローブ生体高分子を標識した蛍光物質を発光させてガラスプレートのスポットに固定化されたプローブ生体高分子の量を求め、更にサンプル生体高分子を標識した蛍光物質を発光させてプローブ生体高分子にハイブリダイズしたサンプル生体高分子の量を求める。そして、その差分を前記プローブの量で規格化した値で、基板上にスポットされたプローブ量に対して、サンプルがどれくらいハイブリダイズしたかを測定する。ここで生体高分子とは、DNA、RNA、蛋白質など、生体を構成する高分子をいう。

【0010】

以上をまとめると、本発明によるハイブリダイゼーション検出方法は、プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量とを検出することを特徴とする。ここでいうプローブとは、基板に固定する生体高分子（例えばDNA）を示し、サンプルとはハイブリダイズに用いる生体高分子（例えばDNA）を示す。

本発明によるハイブリダイゼーション検出方法は、また、プローブとサンプルとのハイブリダイゼーションを検出するハイブリダイゼーション検出方法において、プローブの量と前記プローブに結合したサンプルの量との差分を前記プロー

ブの量で規格化した値を検出することを特徴とする。

【0011】

プローブの量とプローブに結合したサンプルの量の検出は、ハイブリダイゼーションを行う前にプローブの量を検出し、ハイブリダイゼーション終了後にプローブに結合したサンプルの量を検出するようにしてもよいし、ハイブリダイゼーション終了後にプローブの量とプローブに結合したサンプルの量を共に検出するようにしてもよい。

【0012】

プローブの量とプローブに結合したサンプルの量の検出は、プローブとサンプルに各々異なる検出用の標識を付けておき、その標識を検出することで行うことができる。

検出されたプローブの量とプローブに結合したサンプルの量との差分を前記プローブの量で規格化した値はディスプレイに表示することができる。

本発明によるバイオチップは、蛍光物質で標識したプローブをスポットしたことを特徴とする。

【0013】

基板に固定されるプローブ量は、各プローブごと、各基板ごとに異なる。同じプローブが固定されている2個のバイオチップ1、2を用いて、異なるサンプルA、Bについて実験を行ったときを例に挙げて説明する。用いたサンプル及びプローブはDNAであるとする。バイオチップ上のあるプローブが、バイオチップ1には10ng固定され、バイオチップ2には8ng固定されていて、ハイブリダイズ前の蛍光強度が例えば256階調の100と80であったとする。サンプルA、Bをそれぞれこのバイオチップ1、2上のプローブとハイブリダイズしたとき、ハイブリダイズ後の蛍光強度がサンプルAは70、サンプルBは60となつたとすると、このままではサンプルAの方がサンプルBよりもそのDNA量が多いと判断される。しかし、バイオチップにもともと固定されていたプローブの量とそのプローブに結合したサンプルの量との差分をプローブの量で規格化した値を計算して、どのくらいの割合でハイブリダイズしているのかを考えると、

$$\text{サンプルA: } (100 - 70) \div 100 = 0.3$$

サンプルB：(80-60) ÷ 80 = 0.25

となり、プローブとハイブリダイズしたDNAの割合は実際にはサンプルAの方がサンプルBより少ないと見える。このようにハイブリダイズ後の蛍光強度だけでサンプルのDNA量を考えるより、より精密な解析ができる。

【0014】

【発明の実施の形態】

以下、図面を参照して本発明の実施の形態について説明する。ここでは、本発明の一例として、プローブ生体高分子及びサンプル生体高分子が共にDNAである場合について説明するが、DNA以外のRNAや蛋白質に対しても本発明が同様に適用可能であるのは勿論である。

【0015】

図1～図3は、本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図である。図1に示すように、全てのプローブDNA 1a, 1b, 1c, …に同一の蛍光物質2を標識する。蛍光物質2としては、例えばイソチオシアニ酸フルオレセイン(FITC)を使用する。プローブDNA 1aをガラスプレート4にスポット3aとして固定化し、別種のプローブDNA 1b、プローブDNA 1c、…も同様に、スポット3b、スポット3c、…としてガラスプレート4に固定化する。

【0016】

また、図2(a)に示すように、サンプルDNAは全てのサンプルDNA 5a, 5b, 5c, …を蛍光物質6で標識する。蛍光物質6としては、例えばCy5を使用する。ハイブリダイゼーションに当たっては、図2(b)に示すように、プローブDNAとサンプルDNAをハイブリダイズさせるために、プローブDNA 1a, 1b, 1c, …がスポットされたガラスプレート4(図1参照)と蛍光標識したサンプルDNA 5a, 5b, 5c, …とをハイブリダイゼーション溶液7に入れ、ハイブリダイズさせる。ハイブリダイゼーション溶液7は、ホルムアルデヒド、SSC(NaCl, trisodium citrate)、SDS(sodium dodecyl sulfate)、EDTA(ethylenediaminetetraacetic acid)、蒸留水などからなる混合液であり、混合比率は使用するDNAの性質により異なる。

【0017】

このとき、サンプルDNA 5 a, 5 b, 5 c, …とプローブDNAが相補鎖であれば、図2 (c) に示すスポット3 aのプローブDNA 1 aやスポット3 bのプローブDNA 1 bのように、サンプルDNA 5 a, 5 b, 5 c, …とハイブリダイゼーションして二重らせん構造で結合する。一方、両者が相補鎖DNAでなければ、図2 (c) に示すスポット3 cのプローブDNA 1 cのように、サンプルDNAが結合しないでそのままである。つまり、ハイブリダイゼーションが生じたスポット3 aや3 bには、プローブDNA 1 a, 1 bを標識している蛍光物質2と、プローブDNA 1 a, 1 bに結合したサンプルDNA 5 a, 5 bを標識している蛍光物質6が存在する。一方、ハイブリダイゼーションが生じていないスポット3 cには、プローブDNA 1 cを標識している蛍光物質2のみが存在する。

【0018】

ハイブリダイゼーションの検出は、図3に示すように、励起光源としてのランプ9からの励起光でサンプルを標識する蛍光物質6とプローブDNAを蛍光物質2を励起して発光させる。励起光源のランプとしては例えば、発光波長域が約300-約700nmであるキセノンランプを使用する。これは、FITCが励起波長490nm、発光波長520nmであり、Cy5が励起波長650nm、発光波長667nmであるため、両方の蛍光物質を同時に発光させることができるからである。発光の検出にあたっては、FITCの発光を読み取るときは透過波長520nmの光学フィルター10を、Cy5の発光を読み取るときは透過波長667nmの光学フィルター11を用いて二次元光センサー8で読み取る。二次元光センサー8からのデータは、コントローラー12によってコンピュータ13へ転送される。二次元光センサー8としては例えばCCDカメラを使用し、2枚の光学フィルター10, 11はステージ14の駆動によって矢印の方向に移動され、交換される。

【0019】

コンピュータ13では、FITCの発光を読み取ったデータ値から各スポットにおけるプローブDNAの量を求め、Cy5の発光を読み取ったデータ値から各

スポットにおいてプローブDNAとハイブリダイズしたサンプルDNAの量を求める。F I T Cの発光量A_iからC_y5の発光量B_iを引いて得られた差分をF I T Cの発光量で割った評価値C_i [C_i = (A_i - B_i) / A_i] を計算すれば、プローブDNA量からの相対値でハイブリダイズしたサンプルDNA量を求めることができ、高精度な定量測定ができる。

【0020】

上記評価値C_iを計算することにより、評価値C_i [C_i = (A_i - B_i) / A_i] が大きいほどプローブDNAにハイブリダイズしたサンプルDNAの量が少ないことを意味し、反対に評価値C_iが小さいほどプローブDNAにハイブリダイズしたサンプルDNAの量が多い、即ちプローブDNAと相補性があると判断できる。ここで、評価値としてC_i = (A_i - B_i) / A_iを採用したのは、プローブDNA量からハイブリダイズしたサンプルDNA量を引いた方が比較を簡単に行えるからである。つまり、どんな状態でも、基板上に固定されたプローブDNAの方が、そのDNAにハイブリダイズしたサンプルDNAの量より少ないということはないからである。

【0021】

図4は、評価値の処理手順を示すフローチャートである。ステップ11において、評価値を計算するスポットの番号を初期設定する。ステップ12では、スポット_iのF I T Cの発光量A_iとC_y5の発光量B_iを求める。ステップ13では、発光量の差分を発光量A_iで割った値C_i = (A_i - B_i) / A_iを計算する。得られた評価値C_iはハイブリダイズしなかったプローブDNA量に対応し、これからサンプルDNAとプローブDNAとの相補性の程度を判断することができる。ステップ14では、求めた相対値C_iをコンピュータ13の表示部に階調として表示する。このとき、評価値の大きい値は明るく、小さい値は暗く表示する。また、ポジフィルムのようにその反対で表示してもよい。ステップ15では、全てのスポットを処理したかチェックし、全てのスポットの処理が終了していないときはステップ16で次のスポットの位置を求め、ステップ12からの処理を繰り返す。全てのスポットの計算が終了したときは処理を終了する。

【0022】

図5及び図6は、本発明による検出方法の他の例の原理を説明する図である。この検出方法は、ハイブリダイゼーションする前にプローブDNAの量、すなわちプローブDNAに標識したFITC等の発光量を読み取っておき、ハイブリダイゼーション後、サンプルDNAの量、すなわちサンプルDNAに標識したC_y5等の発光量を読み取り、評価値を求める方法である。

【0023】

図5(a)に示すように、例えばFITCのような蛍光物質で標識したプローブDNAをスポット3a, 3b, 3c, …としてガラスプレート4に固定化する。これは、先に図1にて説明したのと同様の方法で行う。次に、ハイブリダイゼーション前に各スポット3a, 3b, 3c, …のプローブDNAの量を読み取るため、図5(b)に示すように、ランプ9からの励起光を照射してプローブDNAに標識したFITCの発光量を二次元光センサー8で読み取る。このとき、二次元光センサー8の光路中には透過波長520nmの光学フィルター10を配置する。これは、先に図3によって説明したFITCの発光量読み取りと同様にして行われる。読み取った各スポットの発光量データA_iは、フロッピーディスク14などの記憶媒体に格納しておく。

【0024】

例えばC_y5からなる蛍光物質6で標識したサンプルDNA5a, 5b, 5c, …とプローブDNAとのハイブリダイゼーションは、図6(a)に示すように、図2(b)で説明したのと同様にして行われる。ハイブリダイゼーションの検出は、図6(b)に示すように、ランプ9からの励起光でガラスプレート4を照射し、C_y5からの発光量を二次元光センサー8で読み取ることによって行われる。このとき、二次元光センサー8の光路中には透過波長667nmの光学フィルター11を配置する。これは、図3で説明したC_y5の発光読み取りと同様である。このあと、フロッピーディスク14に格納されているFITCの発光量データA_iを読み込み、C_y5の発光量データB_iとの差分をとる。各差分はFITCの発光量データA_iで割る。差分の取り方は、図3に示す処理と同様であり、この方法によっても定量測定ができる。

【0025】

この方法は、基板にどの程度プローブDNAが固定化されたか、ハイブリダイゼーションを行う前に分かるため、サンプルDNAの量をどの程度にしてハイブリダイゼーションすればよいか、また、プローブDNAが固定化できなかった無効なスポットの位置などをハイブリダイゼーション前に知ることができるので、事前の対処ができる、効率の良い実験ができる。

【0026】

【発明の効果】

本発明によると、スポットされたプローブの量と、プローブにハイブリダイゼーションしたサンプルの量を知ることができ、その差分を前記プローブの量で規格化した値を求ることでより厳密なハイブリダイズ量（相補性の程度）を計算でき、プローブに結合したサンプルの量を高精度に測定することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】

本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図。

【図2】

本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図。

【図3】

本発明によるハイブリダイゼーション検出方法の一例の原理を説明する図。

【図4】

評価値の処理手順を示すフローチャート。

【図5】

本発明による検出方法の他の例の原理を説明する図。

【図6】

本発明による検出方法の他の例の原理を説明する図。

【図7】

従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図。

【図8】

従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図。

【図9】

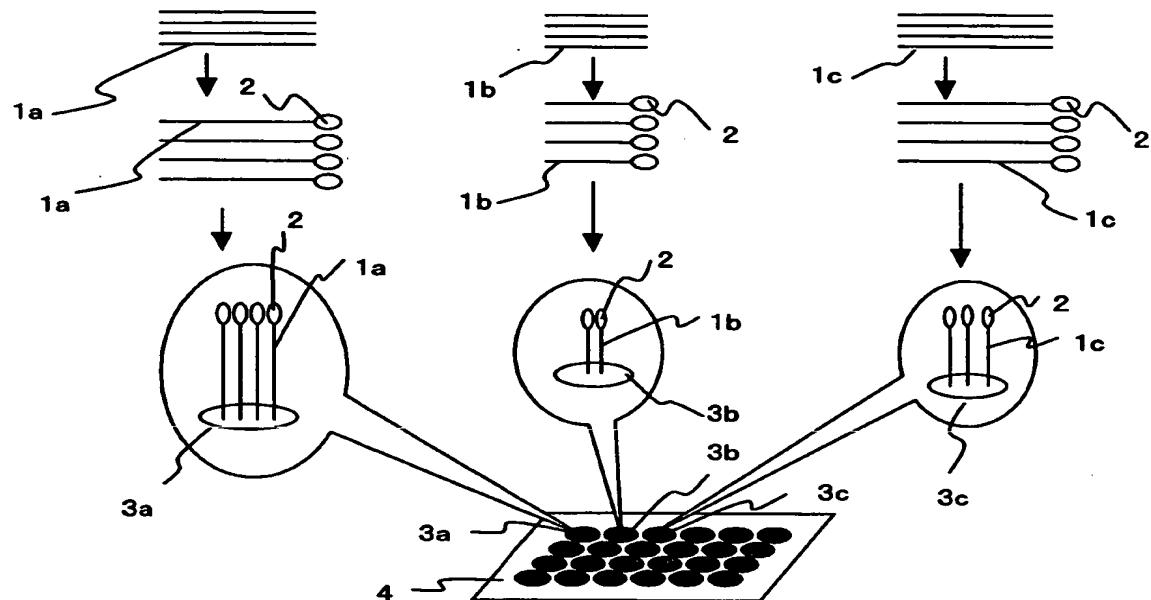
従来のハイブリダイゼーション検出方法の原理を説明する図。

【符号の説明】

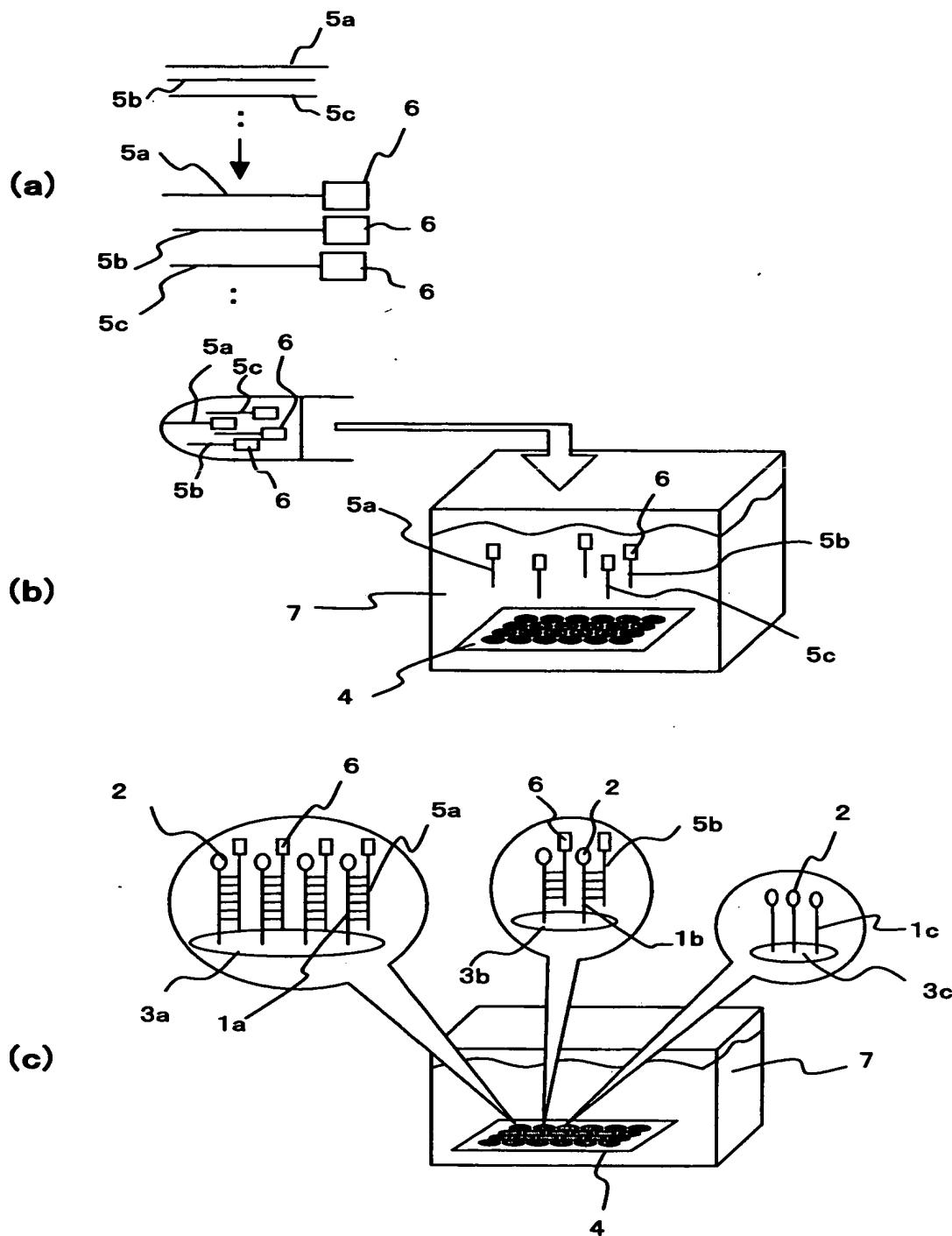
1 a, 1 b, 1 c … プローブDNA、2 … 蛍光物質、3 a, 3 b, 3 c … プローブDNAのスポット、4 … ガラスプレート、5 a, 5 b, 5 c … サンプルDNA、6 … 蛍光物質、7 … ハイブリダイゼーション溶液、8 … 二次元光センサー、9 … 勉起光源、10, 11 … 光学フィルター、12 … コンピュータ、13 … コントローラ、14 … フロッピーディスク

【書類名】 図面

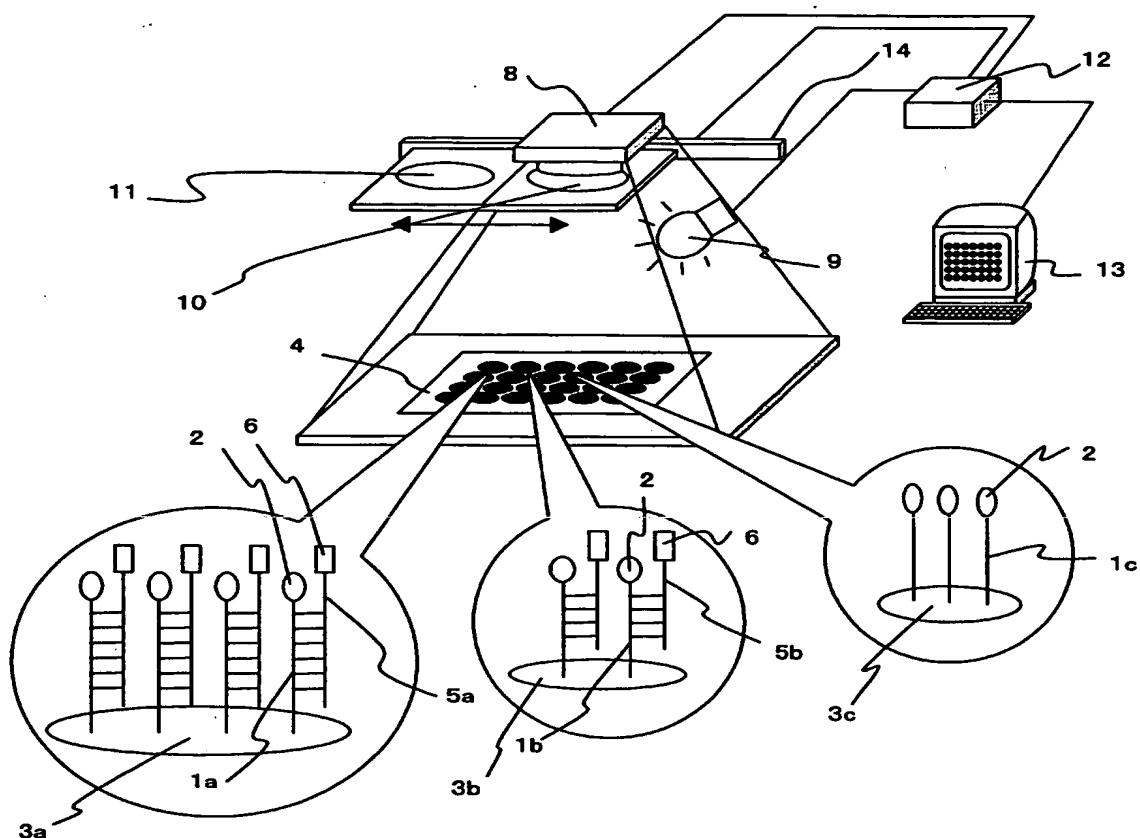
【図1】



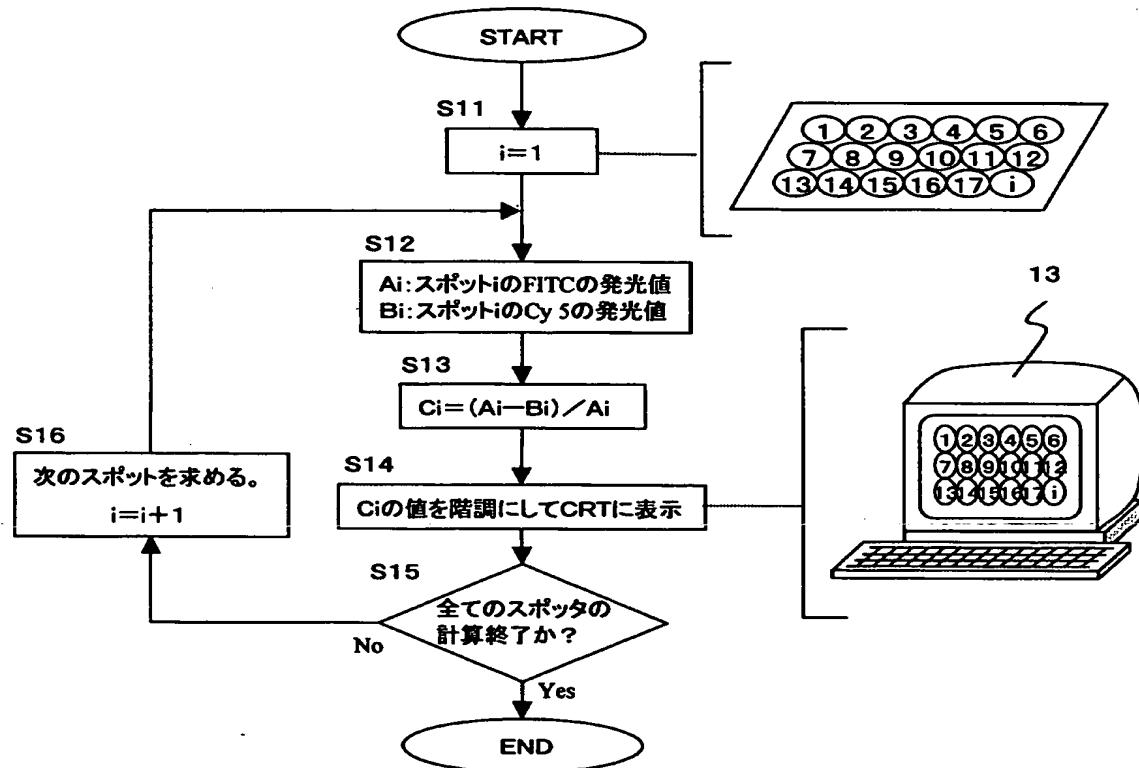
【図2】



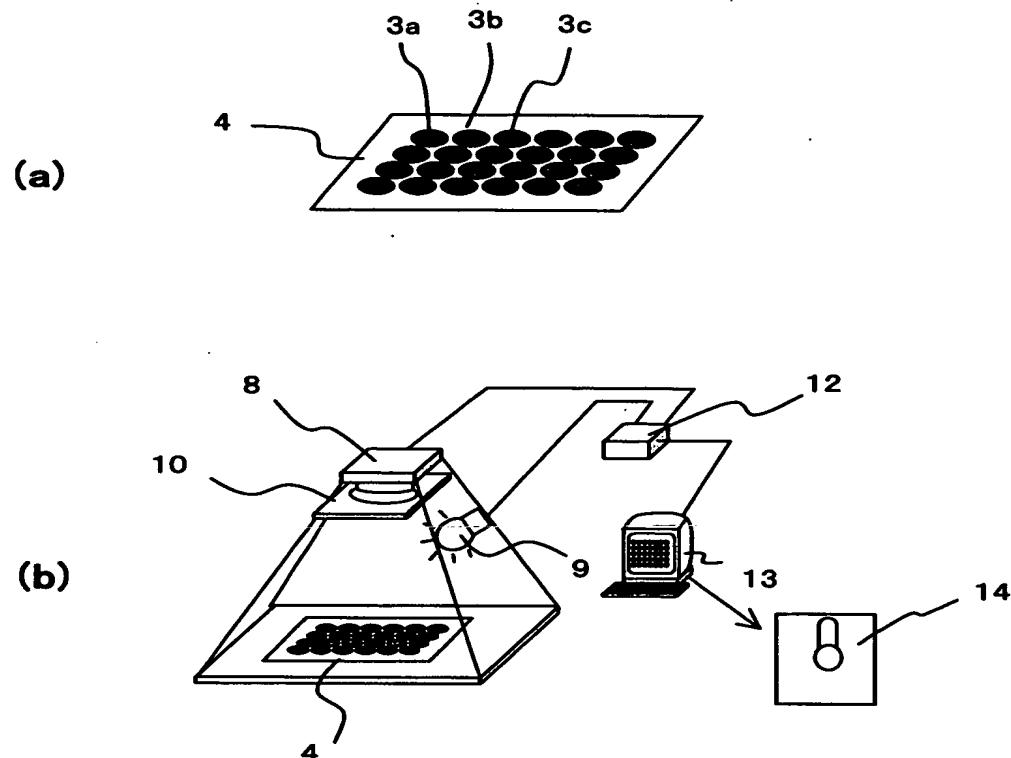
【図3】



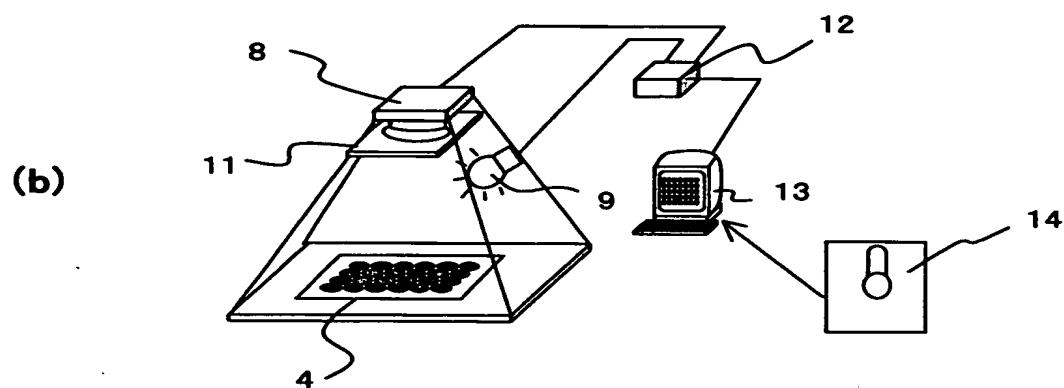
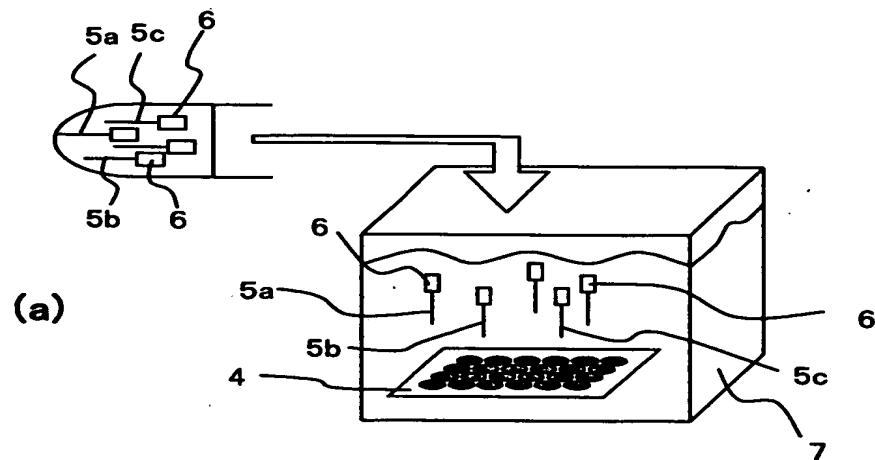
【図4】



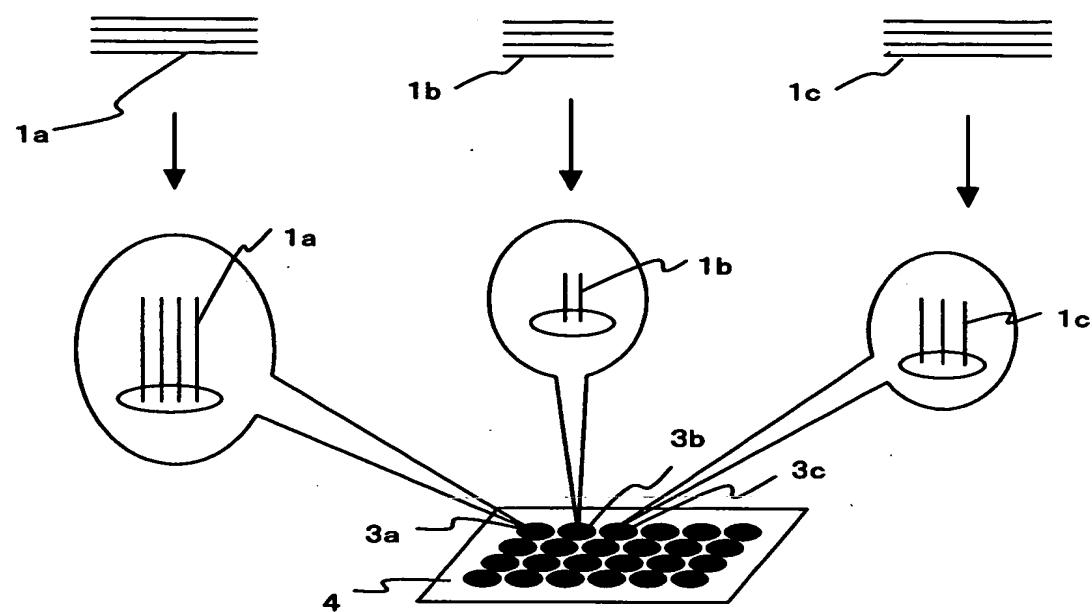
【図5】



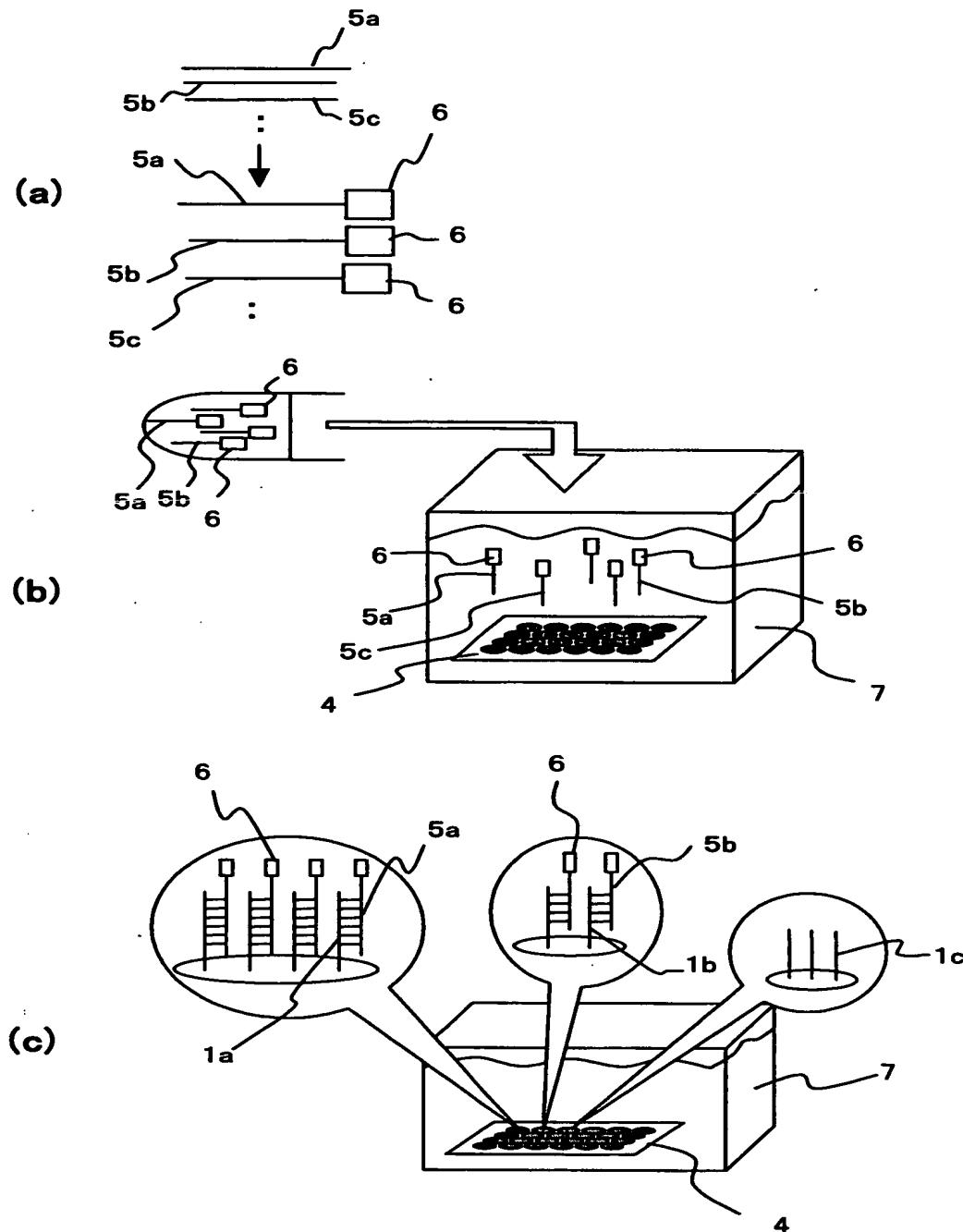
【図6】



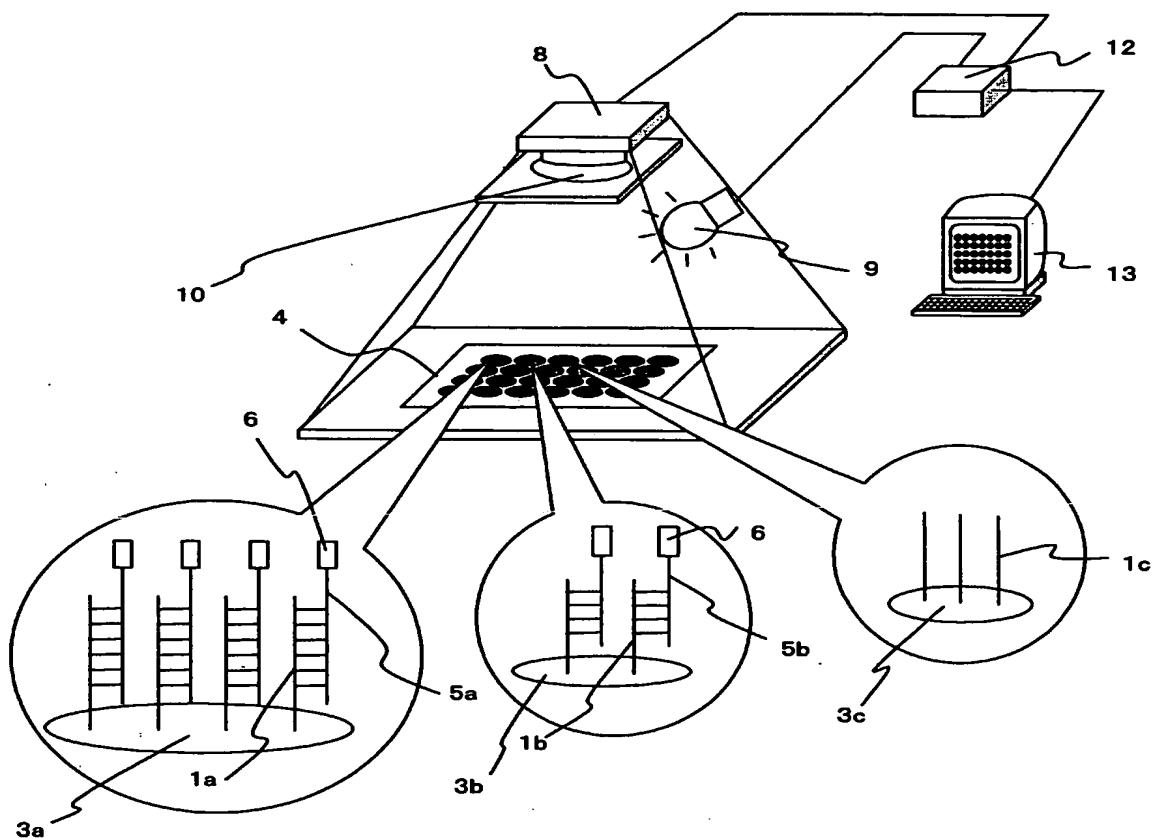
【図7】



【図8】



【図9】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 プローブDNAとサンプルDNAがどの程度ハイブリダイズしたか、定量的な測定を可能とする。

【解決手段】 プローブ1a, 1b, 1cを標識した蛍光物質2を発光させてガラスプレート4のスポット3a, 3b, 3cに固定化されたプローブの量を求め、更にサンプル5a, 5bを標識した蛍光物質6を発光させてプローブにハイブリダイズしたサンプルの量を求める。そして、その差分を前記プローブの量で規格化した値で基板上にスポットされたプローブ量に対して、サンプルがどれくらいハイブリダイズしたかを測定する。

【選択図】 図3

出願人履歴情報

識別番号 [000233055]

1. 変更年月日 1990年 8月 7日

[変更理由] 新規登録

住 所 神奈川県横浜市中区尾上町6丁目81番地

氏 名 日立ソフトウェアエンジニアリング株式会社